



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/42	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22161 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07366</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Oktober 1999 (05.10.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 46 300.6 8. Oktober 1998 (08.10.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEISHEIT, Ralph [DE/DE]; Meisenweg 4, D-82380 Peissenberg (DE). TREIBER, Wolfgang [DE/DE]; Andreas-Schmidtner-Strasse 20a, D-82362 Weilheim (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>
<p>(54) Title: METHOD FOR DETERMINING ALKALINE PHOSPHATASE</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ALKALISCHER PHOSPHATASE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for determining alkaline phosphatase in a sample by optical measurement, characterised in that haemoglobin disturbances are eliminated by using a principle measuring wavelength of 450 ± 10 nm in conjunction with the rate blank technique. The invention also relates to a method for removing the disturbances caused by free haemoglobin or blood substitutes and to the use of the combination of a principal wavelength and the rate blank technique for eliminating disturbances caused by free haemoglobin or blood substitutes during the determination of alkaline phosphatase.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man zur Beseitigung von Hämoglobin-Störungen eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in Kombination mit dem Rate-Blank-Verfahren verwendet, eine Methode zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel, sowie die Verwendung der Kombination einer Hauptmeßwellenlänge mit dem Rate-Blank-Verfahren zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel bei der Bestimmung von alkalischer Phosphatase.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ALKALISCHER PHOSPHATASE

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man zur Beseitigung von Hämoglobin-Störungen eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in Kombination mit dem Rate-Blank-Verfahren verwendet, eine Methode zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel, sowie die Verwendung der Kombination einer Hauptmeßwellenlänge mit dem Rate-Blank-Verfahren zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel.

- 15 Es ist bekannt, daß durch Hämolyse diagnostische Verfahren zur Bestimmung von Analyten teilweise erheblich gestört werden. Unter Hämolyse wird jegliche Zerstörung von Erythrocyten beispielsweise durch mechanische, osmotische, chemische oder enzymatische Einwirkung auf die Zellmembran der Erythrocyten verstanden. Infolge der Hämolyse tritt der Blutfarbstoff Hämoglobin (Hb) aus und ist aus einer Probe nicht mehr zu entfernen.
- 20 Problematisch ist die Anwesenheit von Hämoglobin zum einen aufgrund des mit den Spektren der nachzuweisenden Substanzen und Indikatoren (Chromogenen) zum Teil erheblich überlappenden Absorptionsspektrums von Hämoglobin, wodurch es zu Fehlmessungen in photometrischen Tests kommen kann. Zum anderen kann Hämoglobin auch mit Probenbestandteilen chemisch reagieren, wodurch ebenfalls Substanzen entstehen, die
- 25 Fehlmessungen erzeugen können.

- In letzter Zeit sind für Therapie Zwecke beispielsweise nach hohem Blutverlust immer häufiger Blutersatzmittel im Einsatz, die auf Basis von Hämoglobin hergestellt werden. Das Hämoglobin in Blutersatzmitteln kann nativer, oder synthetischer Natur sein. Oftmals werden auch Hb-analoge Verbindungen eingesetzt. Im Gegensatz zur Hämolyse, bei der im
- 30 allgemeinen ein Hämoglobingehalt von bis zu 500 mg/dl auftritt, ist bei einer Therapie mit

Blutersatzmitteln mit einem Hb-Gehalt im Blutserum bzw. -plasma von mehr als 2000 mg/dl zu rechnen. Störungen in Proben, die Blutersatzmittel enthalten, sind daher oftmals wesentlich ausgeprägter als in hämolytischen Proben, da das Hämoglobin oder das synthetische Analogon von vornherein in freier Form vorliegt.

5

Besonders gravierend ist der Störeinfluß von freiem Hämoglobin bei der photometrischen Bestimmung von alkalischer Phosphatase. Bei der Bestimmung der alkalischen Phosphatase wird die Bildung von 4-Nitrophenol bei 405 bis 415 nm gemessen (Extinktionszunahme).

Hämoglobin absorbiert ebenfalls bei 415 nm. In Gegenwart von Hämoglobin wird die Bestimmung der alkalischen Phosphatase in zweierlei Hinsicht gestört: Zum einen ändert sich im alkalischen Milieu das Hb-Spektrum zeitabhängig (Extinktionsabnahme), zum anderen wird ab einem bestimmten Hb-Gehalt die Photometergrenze des Meßgerätes erreicht.

15 Zur Beseitigung spektraler und chemischer Einflüsse von Hämoglobin auf die Analyse von Serum- oder Plasmaproben sind im Stand der Technik unterschiedliche Verfahren publiziert.

Jay und Provasek beschreiben in Clin Chem 39/9, 1804-1810 (1993), daß die Hämoglobin-
20 störung bei der Bestimmung von alkalischer Phosphatase durch eine zeitabhängige Änderung des Hb-Spektrums verursacht wird. Diese Störung kann durch mathematische Korrekturalgorithmen (Bestimmung der Hb-Konzentration in der Probe und Korrektur des gemessenen Wertes für alkalische Phosphatase um einen bestimmten Betrag, der der gemessenen Hb-Menge äquivalent ist) beseitigt werden.

25 Die von Jay und Provasek erwähnte mathematische Korrektur beseitigt zwar den Hb-Einfluß bis mindestens 800 mg/dl Hb, ist jedoch wenig anwenderfreundlich, da sie eine zusätzliche Messung des Hb-Gehaltes voraussetzt und anschließend noch einen mathematischen Korrekturschritt erfordert.

30

Jay und Provasek (supra) beschreiben eine weitere Methode zur Entstörung durch sogenannte Rate-Blank-Messung. Die Korrektur von Hämolyse-Störungen durch Rate-Blank-Messungen ist auch in der EP-A-0 695 805 beschrieben. Hier wird vor der eigentlichen photometrischen Bestimmung einer in der Probe enthaltenen Komponente die Probe einer
5 Vorreaktion unterworfen, durch die der Hämolysegrad der Probe bestimmt wird. Der nachfolgend erhaltene Meßwert wird dann korrigiert um einen Wert, der durch Korrelation des Hämolysegrades mit dem Meßfehlerbeitrag von störenden Komponenten ermittelt wurde.

Durch Rate-Blank-Messungen kann die Hb-Störung beseitigt werden, allerdings nur bis zu
10 einem Hb-Gehalt von ca. 1200 mg/dl, da bei höherem Hb-Gehalt die Photometergrenze erreicht wird. Dies kann zwar ausreichend für die Beseitigung von Hämolysestörungen sein, ist jedoch keinesfalls ausreichend für die Beseitigung von Blutersatzmittel-Störungen.

Eine weitere Möglichkeit zur Beseitigung von Hämoglobinstörungen wurde für die Bestimmung von Albumin publiziert (PCT-Anmeldung WO 97/45728), wo durch spezielle
15 Kombinationen von Haupt- und Nebenwellenlängen eine Beseitigung von Hämoglobinstörungen erzielt werden konnte. Die hier genannten Wellenlängenkombinationen können jedoch nicht für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase verwendet werden, da bei diesen Wellenlängen kein Meßsignal mehr für 4-Nitrophenol erhalten wird.

20 Die Offenlegungsschrift WO 97/45733 beschreibt, daß mit den Nebenwellenlängen 546 und 570 nm bei einzelnen UV-Tests die Störungen durch Hämoglobin beseitigt werden können. Dieses Verfahren ist jedoch nur auf enzymatische UV-Tests mit einer Hauptmeßwellenlänge von 340 nm anwendbar. Während hierbei eine vollständige Hb-Entstörung allein durch die
25 Nebenwellenlängen 546 bzw. 570 nm erreicht werden kann, ist dies im Fall von enzymatischen Farbtests wie beispielsweise zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase, bei denen die Hauptmeßwellenlänge im Bereich von 415 nm liegt, nicht möglich.

Im US-Patent 5,766,872 wird erwähnt, daß bei der Amylase-Bestimmung die Nebenwellenlänge von 577 nm zu einer Verringerung der Hämolysestörung führt. Aus den angeführten Meßdaten ist jedoch zu erkennen, daß bereits bei einem Hb-Gehalt von 500 mg/dl
30

eine signifikante Meßwertabweichung von bis zu 8 % vorliegt. Das reicht zwar für die Hämolyse-Entstörung, doch ist aufgrund der verwendeten Hauptmeßwellenlänge von ca. 415 nm zu erwarten, daß bei höherem Hb-Gehalt (wie er bei einer Therapie mit Blutersatzmitteln auftritt) diese Meßwertabweichung ebenfalls größer wird und eine ausreichende
5 Hb-Entstörung dann nicht mehr gegeben ist.

Im Stand der Technik ist kein Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase bekannt, das auch in Anwesenheit von hohen Hb-Konzentrationen, wie sie beispielsweise in Blutersatzmittel enthaltenden Proben vorkommen, störungsfrei durchgeführt werden kann.

10

Aufgabe war es daher, ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase in einer Probe zu entwickeln, das die Nachteile des Standes der Technik weitgehend überwindet. Insbesondere sollte ein einfaches und anwenderfreundliches Verfahren zur Beseitigung von Störungen durch Hämoglobin und auf Hämoglobin basierenden

15 Blutersatzmitteln bei der Bestimmung der alkalischen Phosphatase bereit gestellt werden.

Gelöst wird die Aufgabe durch das in den Ansprüchen näher definierte Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in
20 Kombination mit dem Rate-Blank-Verfahren verwendet.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß eine effektive Hb-Entstörung für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase dann möglich ist, wenn zum einen die Hauptwellenlänge geändert wird und zum anderen das Rate-Blank-Verfahren angewendet wird. Für
25 eine zufriedenstellende Hb-Entstörung ist es nicht ausreichend, nur die Hauptwellenlänge zu ändern oder nur das Rate-Blank-Verfahren anzuwenden.

Aufgrund des Absorptionsspektrums von 4-Nitrophenol kann die alkalische Phosphatase nicht nur bei 415 nm gemessen werden, sondern auch bei 450 ± 10 nm. Zwar befindet sich
30 damit die Hauptmeßwellenlänge nicht im üblicherweise verwendeten Absorptionsmaximum

der Nachweisreaktion, sondern an dessen Flanke, aber das erhaltene Meßsignal ist dennoch ausreichend für die exakte Bestimmung der alkalischen Phosphatase.

5 Bereits durch Wahl der neuen Hauptmeßwellenlänge 450 ± 10 nm kommt es zu einer leichten Verringerung der Hämoglobin-Störung, aber eine vollständige Entstörung erhält man überraschenderweise erst durch die Kombination der Hauptwellenlänge 450 ± 10 nm mit dem Rate-Blank-Verfahren.

10 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es erstmals auf einfache Weise möglich, die durch Hämoglobin bzw. Hb-analoge Verbindungen verursachten Störungen bei der Bestimmung von alkalischer Phosphatase bis zu einem Hb-Gehalt von mind. 3000 mg/dl zu beseitigen. Die Obergrenze zur Beseitigung der Hb-Störungen liegt bei der durch die Leistungsfähigkeit des verwendeten Photometers bestimmten Grenze. Bis zu 6500 mg/dl Hämoglobin-Gehalt ist daher eine gute Entstörung durch das erfindungsgemäße Verfahren
15 denkbar.

Im Sinne der Erfindung wird beim Rate-Blank-Verfahren vor der eigentlichen photometrischen Bestimmung einer in der Probe enthaltenen Komponente die Probe einer Vorreaktion unterworfen, durch die der Hämolysegrad der Probe bestimmt wird. Der nachfolgend
20 erhaltene Meßwert der zu bestimmenden Komponente wird dann um einen Wert korrigiert, der durch Korrelation des Hämolysegrades mit dem Meßfehlerbeitrag von störenden Komponenten ermittelt wurde. Das Rate-Blank-Verfahren an sich zur Korrektur von Hämolyse-Störungen ist beispielsweise in der EP-A-0 695 805 und bei Jay und Provasek in Clin Chem 39/9, 1804-1810 (1993), beschrieben.

25

Die für das Rate-Blank-Verfahren verwendete Nebenmeßwellenlänge ist für die Erfindung unerheblich. Auch die Länge des zeitlichen Meßfensters für die Vorreaktion und die Hauptreaktion ist nicht entscheidend. Als geeignet hat es sich erwiesen, die Extinktionsänderungen der Vor- und Hauptreaktion über einen Zeitraum von 1 bis 4 Minuten zu messen.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Bestimmung beliebiger Proben, in denen freies Hämoglobin vorliegt. Der Begriff "freies Hämoglobin" im Sinne der Erfindung wird in Abgrenzung zu solchem Hämoglobin verwendet, das in intakten Erythrocyten enthalten ist. Beispiele für Proben, die freies Hämoglobin enthalten, sind hämolytische Serum- oder Plasmaproben oder Proben, die Blutersatzmittel enthalten. Beispiele für Blutersatzmittel, die im Sinne der vorliegenden Erfindung unter den Begriff "freies Hämoglobin" fallen, sind derivatisierte, polymerisierte, modifizierte oder quervernetzte Derivate von Hämoglobinen, insbesondere von Humanhämoglobin oder Rinderhämoglobin, z. B. DCL-Hämoglobin (Diaspirin-crosslinked Hämoglobin), sowie rekombinant hergestelltes Hämoglobin.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist eine Methode zur Beseitigung von Störungen, die durch freies Hämoglobin hervorgerufen werden, in einem Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase. Die Methode ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in Kombination mit dem Rate-Blank-Verfahren verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in Kombination mit dem Rate-Blank-Verfahren zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder durch auf Hämoglobinbasis hergestellte Blutersatzmittel in einem Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase.

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung weiter.

Beispiel

a) Herstellung der Hämoglobin haltigen Proben

Ein Teil eines Serumpools wurde mit einer Hb-haltigen Lösung derart versetzt, daß ein Hb-Gehalt von mindestens 3000 mg/dl erreicht wurde. Ein anderer gleichgroßer Teil desselben Serumpools wurde mit der äquivalenten Menge NaCl-Lösung (154 mmol/l) versetzt. Beide Teile wurden anschließend in unterschiedlichem Verhältnis derart miteinander vermischt,

daß eine Hb-Konzentrationsreihe aus 11 Proben erhalten wird, deren niedrigste Probe kein Hb und deren höchste Probe mindestens 3000 mg/dl Hb enthält.

5 **b) Bestimmung der alkalischen Phosphatase nach der SFBC-Methode**

Bestimmung nach Empfehlungen der Société Française de Biologie Clinique gemäß Ann. Biol. Clin. Vol 35, 271 (1977)

- 10 Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 911-Analysengerät durchgeführt.

Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

- Reagenz 1: 930 mmol/l 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, pH 10,5;
15 1,03 mmol/l Magnesiumaspartat
- Reagenz 2: 930 mmol/l 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, pH 10,5;
 1,03 mmol/l Magnesiumaspartat; 98 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat

- Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 11 µl Probe wurden 250 µl Reagenz 1 und nach 5 min 50 µl Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte für die Vergleichsmessungen nach einer Dauer von weiteren 50 sec, wobei die Extinktionsänderung während der nachfolgenden 4 min gemessen wurde. Zur Messung wurden Kombinationen folgender
- 5 Hauptmeßwellenlängen (λ_1) und Nebenmeßwellenlängen (λ_2) verwendet: $\lambda_1/\lambda_2 = 415/660$ nm (bisherige Geräteeinstellung), 415/570 nm und 450/660 nm (Vergleich). Als weiterer Vergleich wurde die Bestimmung der alkalischen Phosphatase nach der von Jay und Provasek erwähnten Rate-Blank-Messung durchgeführt (als "415/660 nm RB" bezeichnet).
- 10 Bei der Erfindung wurde für die Analytbestimmung die Meßwellenlängenkombination $\lambda_1/\lambda_2 = 450/660$ nm verwendet. Für die Rate-Blank-Messung wurde die Extinktionsänderung der Vorreaktion in der Zeit von 3,0 - 4,9 min nach Zugabe von Reagenz 1 zur Probe und die Extinktionsänderung der Hauptreaktion in der Zeit von 7,9 - 9,8 min nach Zugabe von Reagenz 1 zur Probe gemessen. Dies entspricht am Boehringer Mannheim/Hitachi 911
- 15 Analysengerät den Meßpunkten [10] - [16] und [25] - [31]. Das Ergebnis ist in der als "450/660 nm RB" bezeichneten Spalte aufgeführt.

- Die Ergebnisse der erfindungsgemäßen Messung sowie der Vergleichsmessungen sind in der nachfolgenden Tabelle 1 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Kombination der neuen Hauptmeßwellenlänge von 450 nm mit dem Rate-Blank-Verfahren die Störung durch Hb-haltige Blutersatzmittel im Vergleich zu den anderen Meßwellenlängenkombinationen bzw. zur Rate-Blank-Messung bei 415 nm
- 20 Hauptwellenlänge drastisch reduziert wird.

Tabelle 1

Gemessener Gehalt an Alkalischer Phosphatase bei 37°C in U/l

Hb-Gehalt* [mg/dl]	415/660 nm	415/570 nm	450/660 nm	415/660 nm RB	450/660 nm RB
0	42	42	42	42	42
300	32	32	35	44	43
600	22	24	29	46	44
900	14	16	24	46	46
1200	8	11	22	44	45
1500	3	7	19	5	47
1800	-2	2	17	0	47
2100	-2	3	17	0	48
2400	-2	3	15	1	50
2700	-1	3	16	0	49
3000	-2	3	19	1	51

* hier wurde ein vernetztes Hämoglobin eingesetzt

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische
5 Messung dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in Kombination mit dem Rate-Blank-Verfahren verwendet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung in einer
Serum- oder Plasmaprobe durchgeführt wird.
- 10 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe bestimmt, die freies Hämoglobin oder ein auf Hämoglobinbasis hergestelltes Blutersatzmittel enthält.
- 15 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Blutersatzmittel ein derivatisiertes, modifiziertes oder quervernetztes Humanhämoglobin oder Rinderhämoglobin oder rekombinant hergestelltes Hämoglobin ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die
20 Probe einen Hämoglobingehalt bis zu 6500 mg/dl aufweist.
6. Methode zur Beseitigung von Störungen, die durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel hervorgerufen werden, in einem Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von $450 \pm$
25 10 nm in Kombination mit dem Rate-Blank-Verfahren verwendet.
7. Verwendung einer Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in Kombination mit dem Rate-Blank-Verfahren zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel in einem Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase.

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C1201/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C120

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 02570 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ; SIEDEL JOACHIM (DE); TOWN MICHAEL HAROLD) 22 January 1998 (1998-01-22) the whole document	1,6,7
A	--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US GLICK, MELVIN R. ET AL: "Analytical systems ranked by freedom from interferences" retrieved from STN Database accession no. 107:112184 XP002128041 abstract & CLIN. CHEM. (WINSTON-SALEM, N. C.) (1987), 33(8), 1453-8 --- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2000

Date of mailing of the international search report

03/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 766 872 A (CYBULSKI RAYMOND LEON) 16 June 1998 (1998-06-16) cited in the application abstract ---	1,6,7
A	WO 97 45728 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;WEISHEIT RALPH (DE); MASTERS BARBARA (US) 4 December 1997 (1997-12-04) cited in the application abstract ---	1,6,7
A	EP 0 695 805 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 7 February 1996 (1996-02-07) cited in the application abstract -----	1,6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Appl. Application No

PCT/EP 99/07366

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9802570	A	22-01-1998	DE 19628484 A CA 2261285 A EP 0923649 A	22-01-1998 22-01-1998 23-06-1999
US 5766872	A	16-06-1998	NONE	
WO 9745728	A	04-12-1997	DE 19622091 A AU 3171797 A CN 1214770 A CZ 9800271 A EP 0906567 A HU 9900723 A PL 330221 A	08-01-1998 05-01-1998 21-04-1999 15-07-1998 07-04-1999 28-07-1999 10-05-1999
EP 0695805	A	07-02-1996	DE 4427492 A JP 2771958 B JP 8101191 A	08-02-1996 02-07-1998 16-04-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte.ionales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07366

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole):

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 02570 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;SIEDEL JOACHIM (DE); TOWN MICHAEL HAROLD) 22. Januar 1998 (1998-01-22) das ganze Dokument	1,6,7
A	--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US GLICK, MELVIN R. ET AL: "Analytical systems ranked by freedom from interferences" retrieved from STN Database accession no. 107:112184 XP002128041 Zusammenfassung & CLIN. CHEM. (WINSTON-SALEM, N. C.) (1987), 33(8), 1453-8 , --- -/-	1



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Januar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 766 872 A (CYBULSKI RAYMOND LEON) 16. Juni 1998 (1998-06-16) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung ----	1,6,7
A	WO 97 45728 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;WEISHEIT RALPH (DE); MASTERS BARBARA (US) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung -----	1,6,7
A	EP 0 695 805 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 7. Februar 1996 (1996-02-07) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung -----	1,6,7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07366

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9802570	A	22-01-1998	DE	19628484 A	22-01-1998
			CA	2261285 A	22-01-1998
			EP	0923649 A	23-06-1999
US 5766872	A	16-06-1998	KEINE		
WO 9745728	A	04-12-1997	DE	19622091 A	08-01-1998
			AU	3171797 A	05-01-1998
			CN	1214770 A	21-04-1999
			CZ	9800271 A	15-07-1998
			EP	0906567 A	07-04-1999
			HU	9900723 A	28-07-1999
			PL	330221 A	10-05-1999
EP 0695805	A	07-02-1996	DE	4427492 A	08-02-1996
			JP	2771958 B	02-07-1998
			JP	8101191 A	16-04-1996

